

ANALISI GENETICHE

Relatori: Elia Vajana, Sara Pinosio, Camilla Avanzi, Francesca Bagnoli, Giovanni Giuseppe Vendramin, Andrea Piotti (CNR-IBBR)

Dalle foglie prelevate da ciascuna delle 254 farnie campionate è stato ottenuto il DNA, seguendo un protocollo di estrazione *standard* leggermente modificato per assicurarsi di ottenere materiale di buona qualità e in quantità sufficiente per la successiva caratterizzazione genetica. La tecnologia SPET (*Single Primer Enrichment Technology*) ha portato alla caratterizzazione, per ciascuna farnia, di 408,219 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs; circa il 3.3% del genoma), localizzati sia in regioni genomiche neutrali che in tutti i geni appartenenti al genoma della specie, inclusi geni candidati legati alla risposta a stress idrico e attacchi parassitari (**Figura 1**).

I dati genetici ottenuti sono stati analizzati con un approccio di analisi di associazione fenotipo-genotipo (GWAS), al fine di identificare marcatori SNP in grado di conferire una certa resistenza al deperimento. Il fenotipo utilizzato per le analisi è l'indice 'onesto' di deperimento dendrocronologico, cioè l'accrescimento medio degli ultimi 20 anni 'pulito' per gli effetti di sito, età e microsito (vedi abstract 'Deperimento e alterazioni della crescita').

Prima di procedere con le analisi di GWAS, sono stati esclusi gli individui e i marcatori SNP con troppi dati genetici mancanti, oltretutto gli individui ibridi, mal classificati e/o imparentati, risultando in un *dataset* finale di 244 individui e 147,200 SNPs di comprovata qualità. È stata valutata anche la presenza di strutturazione genetica entro e tra siti, che può portare ad un'inflazione del tasso di 'falsi positivi' negli studi di GWAS. I metodi utilizzati hanno confermato la sostanziale assenza di strutturazione: i cinque siti fanno parte di un'unica 'popolazione genetica', in cui la percentuale di varianza spiegata dalla suddivisione degli individui nei siti è infinitesimale. Questa evidenza ha portato a svolgere le analisi di GWAS senza necessità di correggere per la struttura genetica.

Tali analisi sono state svolte in maniera indipendente tramite i *software* PLINK ed EMMAx. In entrambi i casi, un modello lineare di associazione fenotipo-genotipo è stato sviluppato per ogni marcatore SNP, ed una correzione per test multipli è stata applicata ai valori di significatività al fine di ridurre il tasso di risultati 'falsi positivi'. Le analisi hanno quindi portato ad individuare un gruppo di 33 marcatori significativi, suggerendo un modello poligenico alla base del deperimento (**Figura 2a**). Gli stessi 33 SNP spiegano una porzione significativa della varianza fenotipica osservata nell'indice 'onesto' di deperimento dendrocronologico (16%), suggerendo un loro possibile impiego come marcatori diagnostici per la selezione di materiale forestale 'resistente', previa necessità di una validazione biologica in campo di questi risultati. Tra le associazioni fenotipo-genotipo di maggiore interesse, si segnala la presenza sul cromosoma 10 di due geni appartenenti alla famiglia genica *RLK*, entrambi noti per il loro coinvolgimento nella risposta a patogeni tra cui l'oidio, ed il gene *GATL10* sul cromosoma 5, noto per la sua attività nella risposta delle querce alla formazione di galle (**Figura 2b**).

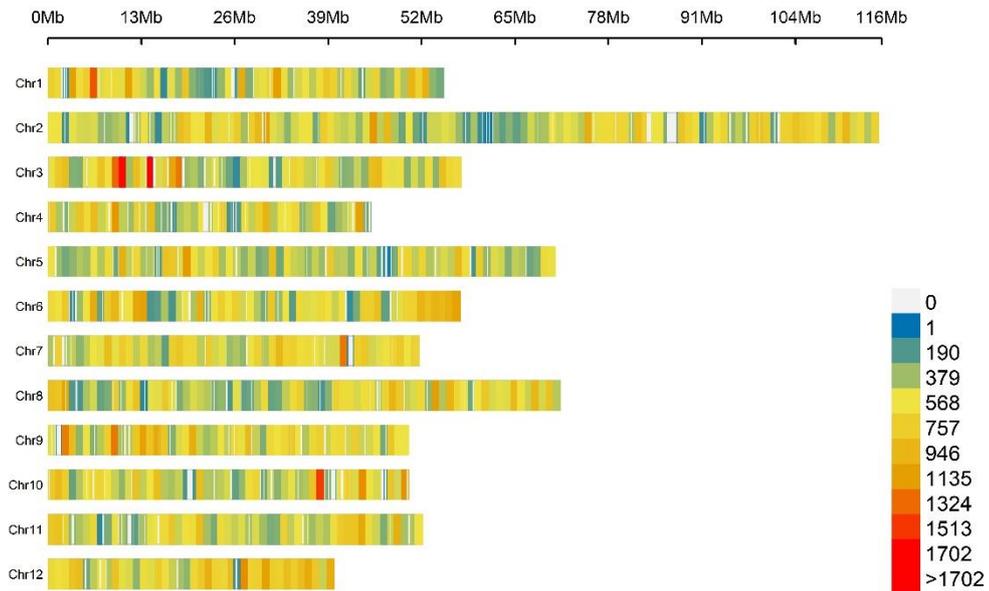


Figura 1. Distribuzione, in finestre di 1 milione di basi (Mb), del numero di SNPs derivanti da genotipizzazione SPET nei 12 cromosomi del genoma di *Quercus robur*. Le zone rosse indicano le porzioni di genoma dove la densità di SNPs è più alta, mentre quelle bianche le porzioni per le quali le sonde SPET non hanno prodotto risultati.

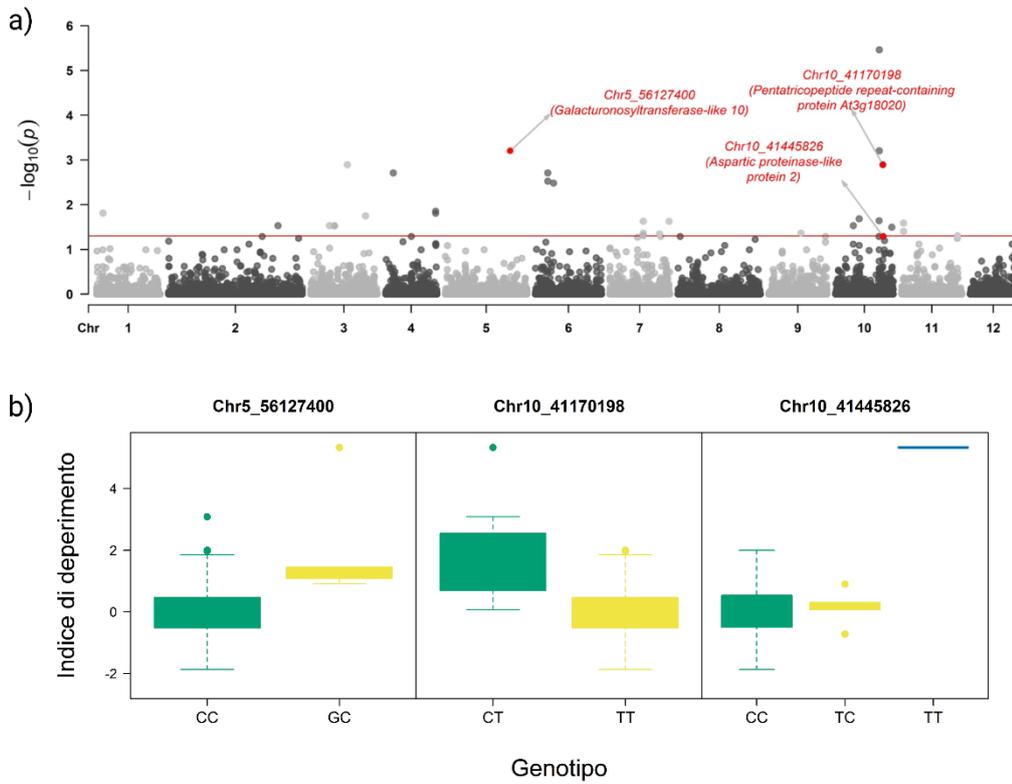


Figure 2. a) *Manhattan plot* raffigurante i risultati dei test di associazione fenotipo-genotipo svolti con il *software* EMMAx. Ogni punto corrisponde ad un marcatore SNP, la cui posizione sul genoma è definita sull'asse delle X, e la cui significatività (corretta per test multipli) sull'asse delle Y. Tanto più alto il picco, tanto maggiore la significatività. La linea rossa corrisponde ad una soglia di significatività del 5% sulla base della quale sono stati identificati i 33 marcatori 'indiziati' di conferire un certo grado di resistenza al deperimento. **b)** Distribuzione dell'indice 'onesto' di deperimento dendrocronologico in funzione dei genotipi osservati per tre dei 33 marcatori in esame discussi nel testo: specifici genotipi sembrano essere associati o ad un maggior stato di salute (valori alti dell'indice di deperimento) o maggiore deperimento (valori bassi dell'indice di deperimento).